



GRADO EN MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO

**TERAPIA GÉNICA PARA EL
TRATAMIENTO DE LAS RETINOPATÍAS**

**GENE THERAPY FOR THE TREATMENT
OF RETINOPATHIES**

Autor: D. Carlos Fernández Fernández

Director: D. Gabriel Moncalián Montes

Santander, Mayo 2020

ÍNDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. RETINOPATÍAS	6
2.2. Retinitis pigmentaria	8
2.3. Distrofia de conos y bastones	9
2.4. Degeneración macular juvenil	9
2.5. Coroideremia	10
2.6. Acromatopsia	11
3. TRATAMIENTO NO GÉNICO DE LAS RETINOPATÍAS	11
4. TERAPIA GÉNICA.....	13
4.1. Introducción a la terapia génica.....	13
4.2. Terapia génica en las retinopatías congénitas	16
4.2.1. Vectores utilizados	17
4.2.2. Amaurosis congénita de Leber.....	18
4.2.3. Enfermedad de Stargardt	25
4.2.4. Retinitis Pigmentaria	26
4.2.5. Síndrome de Usher.....	26
4.2.6. Coroideremia	27
4.2.7. Retinosquisis ligada al X	28
4.2.8. Acromatopsia.....	28
5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS	29
BIBLIOGRAFÍA:.....	31

RESUMEN

Las retinopatías son un amplio grupo de patologías no inflamatorias que producen alteraciones en la retina, la capa interna de la envoltura ocular responsable de la transducción de la señal luminosa desde el ojo hasta el cerebro. Dependiendo de la etiología de la enfermedad pueden clasificarse en distintos grupos. En este trabajo se ahondará en el grupo de las retinopatías de causa genética, es decir, en las retinopatías hereditarias, y más concretamente en su novedoso tratamiento mediante terapia génica. La terapia génica ha sido un campo ampliamente estudiado desde su desarrollo en los años 80 y cuya investigación se encuentra actualmente muy en boga para tratar múltiples enfermedades que afectan al ser humano. El principio en el que se basa esta técnica es en la sustitución o modificación del gen mutado causante de la enfermedad a través de técnicas genéticas y moleculares. Dentro del campo de la terapia génica los primeros ensayos con transducción a células fotorreceptoras se llevaron a cabo en 2001 en modelos animales y más tarde, en 2009, en humanos. La principal vía de abordaje de esta terapia en el ojo es la inyección de vectores capaces de transducir el material genético defectivo en el huésped directamente sobre las células fotorreceptoras de la retina. En la actualidad ya se ha comercializado el primer medicamento basado en esta técnica, Luxturna (Spark Therapeutics), que contienen virus asociados a adenovirus portadores del gen RPE65 para tratar la Amaurosis congénita de Leber tipo 2. Otras muchas patologías que afectan a la retina están siendo investigadas y se convertirán en dianas terapéuticas para la terapia génica en seres humanos.

ABSTRACT

Retinopathies are a wide group of non-inflammatory diseases that cause alterations in the retina, which is the inner layer of the eye cover and responsible for the transduction of the light signal from the eye to the brain. Depending on its cause, retinopathies can be classified in different groups. This work is focused in the ones caused by genetics, the hereditary retinopathies and more precisely into its treatment with the new gene therapy techniques. Gene therapy has been a widespread field of study from its origin in the 80s and still is a very important field of investigation for the treatment of multiple human diseases. The principle in which this therapy is sustained is the substitution or modification of the defective gene through genetic and molecular techniques. Within the field of the gene therapy the first studies date from 2001 in animal models and 2009 in humans. The main approach of this therapy in the eye consists in the injection of vectors capable of transducing the desired genetic material into the retinal cells. Nowadays there is already one medicine in the market based on this technique, Luxturna (Spark Therapeutics), which contains adeno-associated viruses carrying RPE65 gene to treat type 2 Leber's congenital amaurosis. Even more different diseases affecting the retina are being investigated and would become therapeutic targets for gene therapy in humans in a near future.

1. INTRODUCCIÓN

La visión es uno de los sentidos a través de los cuales el ser humano percibe e interactúa con su entorno. El órgano sensor encargado de la visión es el ojo, que a través de sus receptores localizados en la retina es capaz de transformar las ondas electromagnéticas que emite lo que nos rodea en impulsos nerviosos que, a través del nervio óptico y el resto de la vía óptica, alcanzan la corteza cerebral donde se forman las imágenes. Además por esta vía también se transmiten reflejos visuales y regulación de los ritmos circadianos.

Aunque el ojo es un órgano realmente complejo (Figura 1), en este trabajo nos centraremos en la estructura que contiene no solamente los fotorreceptores, sino también las dos primeras neuronas de la vía óptica, la retina.

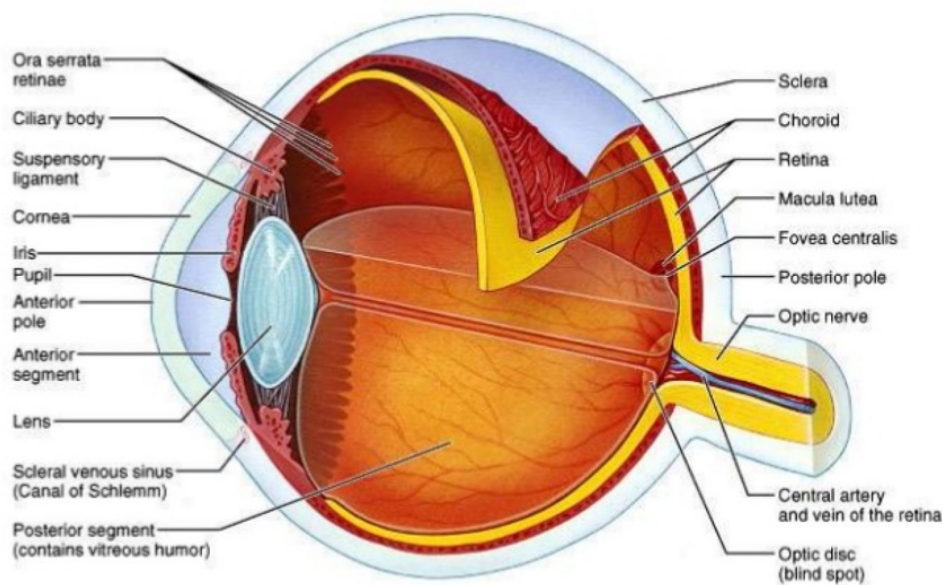


Figura 1. Estructura del ojo humano. En la figura se representan las diferentes regiones del ojo humano, en la derecha de arriba a abajo: Ora serrata, Cuerpo ciliar, ligamento suspensorio, cornea, iris, pupila, polo anterior, segmento anterior, lente, seno venoso esclerótica, segmento posterior (contiene el humor vítreo); en la izquierda de arriba abajo: esclerótica, coroides, retina, mácula lútea, fóvea central, polo posterior, nervio óptico, arteria y vena centrales de la retina, disco óptico (punto ciego). Modificado de *Human Anatomy and Physiology Cummings B.* [1]

La retina es un derivado del ectodermo que se sitúa por dentro del globo ocular dejando por fuera a la coroides y por dentro a la membrana hialoidea del cuerpo vítreo. Por delante se adelgaza progresivamente y a partir de la denominada ora serrata es ciega, al igual que en su límite posterior en la papila óptica, lugar donde nace el nervio óptico.

La retina se puede dividir en diez capas diferentes atendiendo a su contenido celular (Figura 2). Las capas de la retina son las siguientes:

1. Epitelio pigmentario
2. Fotorreceptores (Conos y bastones)
3. Membrana limitante externa
4. Capa nuclear externa (células fotorreceptoras)
5. Capa plexiforme externa
6. Capa nuclear interna (células bipolares, interneuronas y células de Müller)
7. Capa plexiforme interna
8. Células ganglionares
9. Fibras de nervio óptico
10. Membrana limitante interna

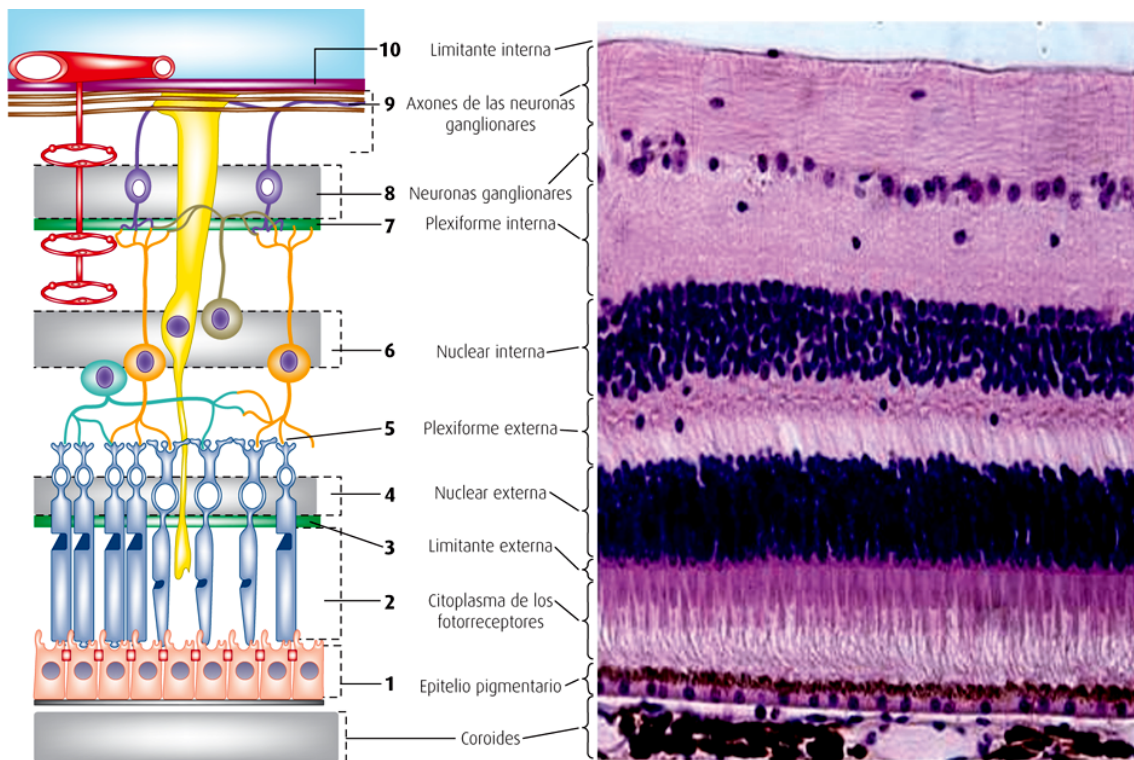


Figura 2. Retina humana. En la figura se indican las diferentes capas de la retina humana en un corte histológico. Tomado de Sepúlveda Saavedra. [2]

Cabe destacar dentro del epitelio pigmentario la presencia de dos fotorreceptores distintos (Figura 3). Por un lado están los conos, que como su propio nombre indica, tienen forma cónica, frente a los bastones que tienen forma cilíndrica. Los conos son los principales encargados de la visión diurna, tienen una mayor agudeza espacial y para captar el color. Por su parte los bastones se encargan de la visión en condiciones de baja iluminación ya que poseen mayor pigmento visual, pero ofrecen una visión monocromática. La distribución de ambos tipos celulares es desigual a lo largo de toda la retina. Los conos, que son muy inferiores en número, incrementan su concentración según se acercan a la mácula.

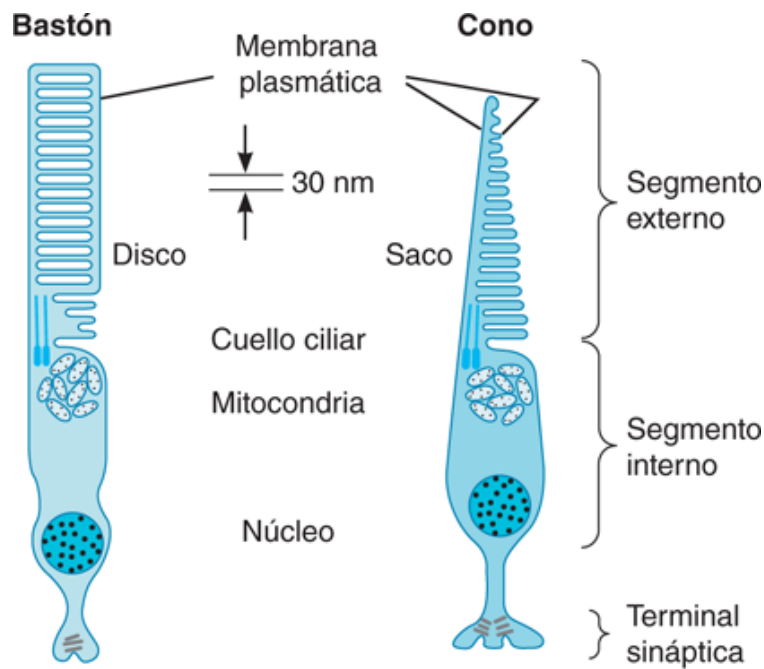


Figura 3. Fotorreceptores de la retina. En la figura se representan los dos tipos de células fotorreceptoras del epitelio pigmentario de la retina del ojo humano, los bastones tienen forma cilíndrica y son más alargados que los conos. Tomado de Ganong Fisiología Médica. [3]

La mácula lútea, o mancha amarilla, es una zona elíptica localizada en el polo posterior del ojo en la que se encuentra la mayor concentración de conos. La papila se encuentra en posición nasal e inferior respecto a la mácula. En el centro de la mácula se encuentra la fovea, punto de mayor agudeza visual de toda la retina, ya que en ella prácticamente solo existen conos. La distribución de bastones es inversa respecto a la de conos, es decir, predominan en la periferia y su número disminuye según se acercan a la fovea.¹ En la Figura 4 se muestra la localización de la mácula, la papila y la fovea.

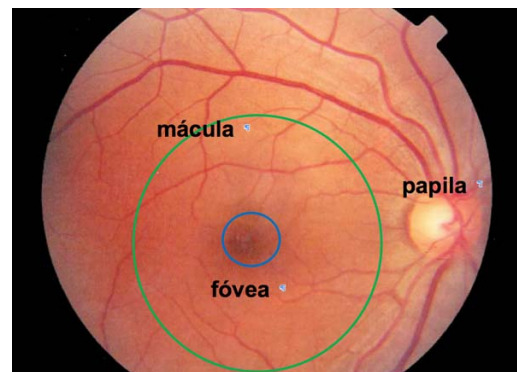


Figura 4. Fondo de ojo humano. En la figura se delimitan las diferentes áreas del fondo de ojo humano. Tomado de Ocumed. [4]

2. RETINOPATÍAS

El término retinopatía incluye una amplia lista de patologías no inflamatorias entre las que destaca por su alta prevalencia la retinopatía diabética, que es la principal complicación de la diabetes. El 75% de los pacientes con diabetes mellitus tipo 1 y el 50% con el tipo 2 padecen retinopatía asociada.² En segundo puesto en prevalencia está la retinopatía hipertensiva, que se produce por el daño causado por la elevación de la presión sanguínea a nivel de los vasos retinianos.³ En este trabajo, sin embargo, se ahondará en un grupo de retinopatías que debido a su etiología genética son candidatas a la terapia génica, las retinopatías hereditarias.

2.1. Amaurosis congénita de Leber (LCA)

Es una retinopatía congénita de herencia autosómica recesiva que afecta a entre 1 de cada 33.000 y 1 de cada 81.000 nacidos vivos (1,2 de cada 100.000 en España), representando algo más del 5% de las retinopatías hereditarias. La enfermedad se caracteriza por presentar disminución de la agudeza visual progresiva, nistagmo, reflejos pupilares lentos y mala o ausente actividad electrorretinográfica. Los niños afectados suelen comenzar a percibir la sintomatología antes de los 5 años y a los 30-40 años de edad pueden haber perdido completamente la visión.

Los niños afectados por la LCA suelen presentar defectos de acomodación visual, siendo frecuente que aparezca hipermetropía severa y más raramente miopía severa. El examen del fondo de ojo puede ser normal, pero en estadios avanzados de la enfermedad, y dependiendo de las mutaciones que posea el paciente, se pueden observar casos de palidez de la papila, atenuación de los vasos retinianos, retinopatía pigmentaria periférica, drusas o papiledema.

Actualmente se han descubierto mutaciones en unos 25 genes responsables del 70-80% de todos los casos de la enfermedad. La primera mutación se encontró en el gen GUCY2D, que codifica la guanidato-ciclasa retiniana 1 (RetGC1), un enzima que se encarga producir GMPc a partir de GTP restaurando los niveles de GMPc citoplásmico a su nivel de oscuridad y por tanto contribuyendo a la recuperación de los fotorreceptores (conos primordialmente) tras la fototransducción. El déficit de función en un alelo de este gen provoca la LCA1 (Tabla 1), culpable de entre el 10 y el 20% de casos de la enfermedad. Este déficit funcional se traduce en un efecto de exposición lumínica constante al ser los fotorreceptores incapaces de recuperarse a su estado basal.

Una mutación autosómica recesiva del gen RPE65 es responsable de la LCA2 (Tabla 1) que supone entre el 5 y el 10% de los casos de LCA y ha sido objeto de numerosos ensayos clínicos. La mutación conlleva un déficit en la producción de la isomerasa retinal, un enzima importante en el ciclo visual. El retinal es una proteína que forma parte del pigmento de la rodopsina y se encuentra en su forma cis en la oscuridad, pero cuando un fotón de luz es absorbido pasa a su forma trans gracias a la isomerasa y esto permite la transducción de la señal luminosa. Típicamente este subtipo de la enfermedad se manifiesta en el

examen de fondo de ojo como la denominada retinopatía en sal y pimienta, atenuación de las arteriolas y palidez macular (Figura 5)^{4,5}

La LCA10 está provocada por una mutación autosómica recesiva en el gen CEP290, encargado de codificar una proteína importante para los centrómeros y los cilios de los fotorreceptores y responsable de un alto porcentaje de los casos de la enfermedad.⁴

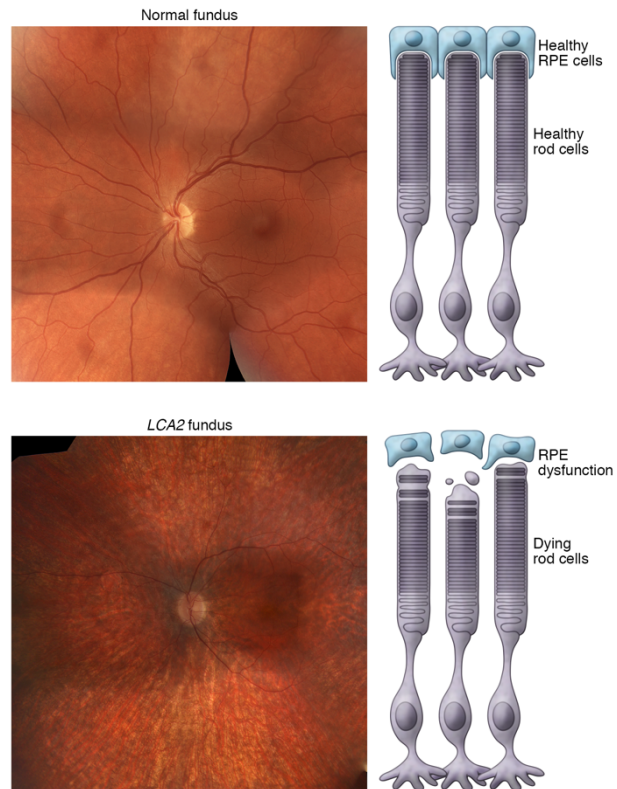


Figura 5. LCA2. En la figura se muestra un fondo normal frente a uno de un paciente con LCA2. Se observa una retinopatía en sal y pimienta, atenuación de las arteriolas y palidez macular. Tomado de *The Journal of Clinical Investigation* [5]

Tabla 1. Principales fenotipos de Amaurosis Congénita de Leber

Locus	Gen causante	Proteína	Función de la proteína	Características diferenciales	Frec.
<u>LCA1</u>	GUCY2D	Guanilato-ciclasa 1	Fototransducción	Fondo de ojo normal, ↑fotofobia, actividad mínima de bastones preservada, ↓↓agudeza visual y del color	10-20%
<u>LCA2</u>	RPE65	Isomerasa retinal	Ciclo retiniano	↑↑Nictalopia desde el nacimiento, actividad residual de conos, ausencia o débil nistagmos	5-10%
<u>LCA10</u>	CEP290	Proteína centrosómica 290 kDA	Transporte ciliar en los fotorreceptores	Muy variable tanto en sintomatología como en la edad de presentación de la misma.	15-20%

2.2. Retinitis pigmentaria

La retinitis pigmentaria (RP) o distrofia retiniana hereditaria es una enfermedad genética que afecta a 1 de cada 5.000 personas a nivel mundial (retinopatía hereditaria más frecuente). En esta se produce la muerte de los bastones por fenómenos de apoptosis, toxicidad lumínica, estrés del retículo endoplásmico y disfunción del transporte ciliar, produciendo generalmente afectación bilateral.

La mayoría de los casos se producen por mutaciones espontaneas, frente a un 20% de los casos consecuencia de herencia autosómica recesiva, el 10-20% autosómica dominante y el 10% asociada al cromosoma X, es decir, existe una heterogeneidad de locus. Existe una ligera diferencia en la incidencia entre sexos, afectando preferentemente a varones.

La mayoría de los enfermos presentarán sintomatología antes de los treinta años de edad. El síntoma más temprano de la retinitis pigmentaria es la pérdida de la visión nocturna seguido de un estrechamiento de los campos visuales. Generalmente persiste algo de visión, incluso en estadios muy avanzados, al conservarse la integridad de la mácula, aunque en algunos casos la toxicidad generada por la muerte de los bastones puede inducir apoptosis en los conos. En dichos casos, el paciente podrá tener, además, alteraciones en la percepción del color. La retinitis pigmentaria en un 20-30% de los casos se puede presentar como parte del síndrome de Usher, en el que también existe pérdida auditiva neurosensorial. Además estos pacientes presentan un riesgo ligeramente superior al de la población general de padecer queratocono y patología de refracción.

La retinitis pigmentaria presenta una triada típica en el examen de fondo de ojo muy útil para su diagnóstico (Figura 6). La triada consiste en la presencia de espículas óseas —que son el depósito del pigmento— la atenuación de los vasos retinianos, posiblemente debido a la muerte masiva de las células y la consecuente disminución de los requerimientos metabólicos; y palidez cérica de la papila, probablemente asociado con una proliferación de células de la glía en dicha zona.

Otras pruebas que deben realizarse en la evaluación de un paciente con posible RP son la campimetría, un examen de la función retiniana y una evaluación de la agudeza visual y del color. Un estudio electrofisiológico de la retina podría orientar hacia el diagnóstico en estadios muy tempranos en los que aun no se presente la triada típica en el fondo de ojo.⁶



Figura 6. Retinitis Pigmentaria. Se observan en la figura del fondo de ojo espículas óseas, atenuación de vasos retinianos y palidez cérica de la papila. Tomado de StatPearls. [6]

2.3. Distrofia de conos y bastones

Es una retinopatía hereditaria que se manifiesta como pérdida de agudeza visual central, del color y fotofobia consecuencia de la degeneración temprana (en la primera década de la vida) de los conos y más adelante de los bastones, consecuencia de lo cual se producirá nictalopía seguida de ceguera legal hacia los 23 años de edad. La presentación típica es la presencia de un escotoma central y más o menos una década después la aparición de escotomas periféricos. La mutación de unos 32 genes ha sido asociada con la enfermedad y su herencia es predominantemente autosómica recesiva. Su diagnóstico se basa en las anomalías electrorretinográficas, en el examen de fondo de ojo —que suele revelar un patrón en ojo de buey con atrofia pigmentaria bilateral simétrica y más adelante periférica con espículas óseas— y otras pruebas como la autofluorescencia del fondo de ojo que se correlaciona muy bien con la severidad de la enfermedad.⁷

2.4. Degeneración macular juvenil

Comprende un grupo de retinopatías causantes de pérdida de agudeza visual y/o nistagmo en niños. La principal enfermedad del grupo es la enfermedad de Stargardt con una prevalencia de 1 entre cada 10.000 y su principal causante es una mutación en el gen ABCA4, que causa apoptosis de las células del epitelio retiniano por acumulación de lipofusina, un pigmento de desgaste formado por la dimerización patológica de la vitamina A. La enfermedad de Stargardt se suele presentar en la primera o segunda década de la vida, siendo de mejor pronóstico cuanto más tarde se expresa la sintomatología. El examen oftalmoscópico suele ser normal al comienzo de la pérdida de visión y muchas veces se piensa que el niño finge dicha sintomatología, pero más adelante se pueden apreciar atrofia en la fovea y drusas en la mácula que se van extendiendo. La angiografía con fluoresceína muestra una mácula negra o apagada en el 75% de los casos debido a la presencia de lipofusina, aunque esta se ha visto superada por la autofluorescencia que muestra hiperfluorescencia de las drusas al comienzo de la enfermedad e hipofluorescencia de las mismas según avanza. El examen de Tomografía de Coherencia Óptica (OCT) se utiliza para el diagnóstico y evaluación periódica de la evolución de la enfermedad y muestra pérdida de las capas externas a demás de un engrosamiento de la capa limitante externa en los casos de comienzo temprano.⁸

Dentro del grupo de las degeneraciones maculares juveniles, aparte de la enfermedad de Stargardt, existe otra entidad, la retinosquiasis ligada al X. Esta enfermedad tiene una prevalencia de 1 entre cada 5000-25000 individuos la mutación causante de esta enfermedad se encuentra en el gen RS1, que codifica una proteína de unión de la membrana plasmática de diferentes capas de la retina y que forma parte de la señalización entre las células de la retina. Su déficit produce los “Quisis” o separaciones entre las capas retinianas que junto a la formación de quistes maculares, producen la pérdida de visión.⁵

2.5. Coroideremia

Es una retinopatía de herencia ligada al cromosoma X que presenta afectación en varones con una mutación del gen CMH que causa una alteración en la producción de la proteína REP-1 (Rab escort protein-1). REP1 es una proteína ubicua en las células del cuerpo humano encargada de escoltar a la Rab-GDP recién sintetizada por la célula hasta las vesículas intracelulares. La Rab-GDP es la encargada de la fusión de las vesículas intracelulares con las membranas celulares (Figura 7). La disfunción del gen CMH solo afecta a la retina debido a que otra molécula de la misma familia, la REP2, suple el déficit funcional en todos los tejidos excepto en la retina, donde actúa un subtipo de la proteína Rab específico para este tejido, la Rab27, la cual se une de forma mucho más eficaz a REP1 que a REP2. Como consecuencia de esto se produce nictalopía, y disminución progresiva del campo visual con un escotoma en forma de anillo, viéndose preservada la agudeza visual hasta edades muy avanzadas. En el examen de fondo de ojo encontraremos áreas parcheadas de degeneración retinianas en la periferia que se irán extendiendo y también de la capa coriocapilar interna. Además se ha asociado con la presencia de cataratas subcapsulares posteriores y edema de la mácula. Las mujeres portadoras, por su parte, se suelen presentar asintomáticas pero con alteraciones muy discretas en el examen de fondo de ojo, y rara vez, a edades muy avanzadas, presentan nictalopía o disminución del campo visual.⁹⁻¹¹

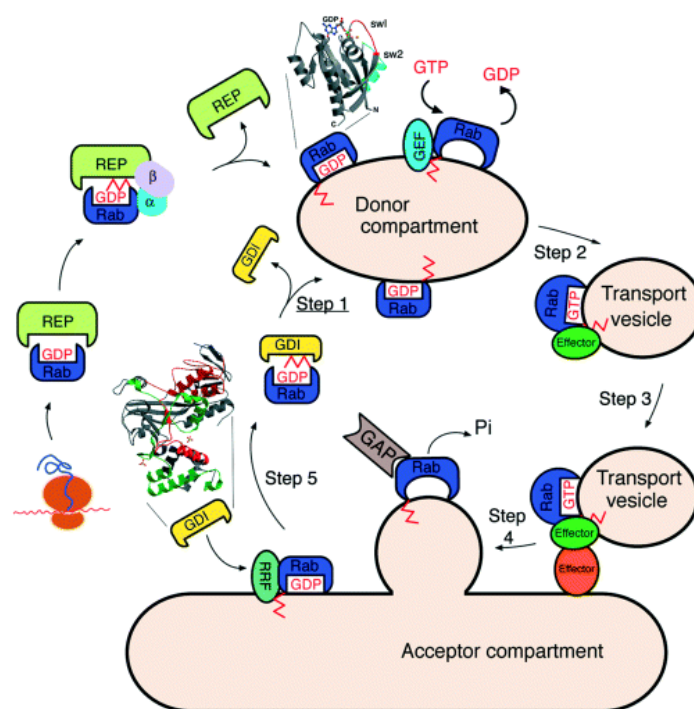


Figura 7. Ciclo de la proteína Rab. La proteína Rab-GDP, esencial para la unión de vesículas intracelulares a membranas, es sintetizada por los ribosomas y liberada al citoplasma, donde se une a la proteína REP que la escolta hasta la membrana de las vesículas intracelulares donde ejercerá su función. Tomado de Traffic. [7]

2.6. Acromatopsia

Existen otras alteraciones de la retina que cursan con pérdida de la capacidad de la percepción de los colores como es el caso de la acromatopsia, una enfermedad autosómica recesiva en la que a demás se produce nistagmo, fotofobia y pérdida de la agudeza visual. Hoy en día se conocen varias mutaciones que causan la enfermedad, entre las que destaca la del gen CNGB3, culpable del 50% de los casos. Dicho gen codifica la un canal B3 iónico dependiente de cGMP que forma parte de la cadena de transducción eléctrica de los conos.⁵

3. TRATAMIENTO NO GÉNICO DE LAS RETINOPATÍAS

Las retinopatías congénitas han sido tradicionalmente tratadas como patologías incurables, informando a las familias sobre la enfermedad y realizando un seguimiento médico de los pacientes.

Históricamente se han propuesto algunas opciones terapéuticas basadas en suplementos nutricionales como por ejemplo la Vitamina A ya que algunos estudios demostraban una progresión más lenta de estas la enfermedades con dicho suplemento. La Vitamina A en su forma activa, también denominada retinol, es la sustancia a partir de la cual se forman los pigmentos de los fotorreceptores retinianos y es el precursor del retinal de la rodopsina. Tradicionalmente se han utilizado suplementos alimenticios ricos en vitamina A que podrían ayudar en las retinopatías con pérdida de fotorreceptores en pacientes con una dieta pobre en dicha vitamina beneficiándose de una mejor función visual gracias a los suplementos. Estos suplementos de vitamina A se siguen utilizando a día de hoy con el objetivo de frenar la progresión de la Retinosis pigmentaria. La vitamina A debe evitarse durante el embarazo o en mujeres en edad fértil por el riesgo de malformaciones congénitas, también deben evitarse en caso de enfermedad hepática previa por aumento de la esteatosis o si el paciente padece la enfermedad de Stargardt con mutación del gen ABCA4 ya que acelera la progresión de esta. Además de esto, al estudiar la patogénesis de las enfermedades con degeneración progresiva de la retina, se creó una Vitamina A (ALK-001) que dimeriza más lentamente en la célula fotorreceptora y parece tener un futuro prometedor en la terapia de algunas patologías como la enfermedad de Stargardt ya que en el caso del tratamiento con ALK-001 no se acumula lipofuscina¹²⁻¹⁴ (ver 2.4.).

Los suplementos con Luteína podrían tener un ligero efecto beneficioso o protector sobre la retinosis pigmentaria. Y por su parte, los beta carotenos han demostrado beneficio como suplemento diario a altas dosis (60mg), aunque en dosis superiores a 20mg diarios son desaconsejados en fumadores y en personas que han estado expuestas al asbesto por aumentar el riesgo de cáncer de pulmón.¹⁴

Hay una serie de sustancias que han sido agrupadas bajo el nombre de modificadores del ciclo visual. Este grupo de fármacos tienen como fin disminuir la concentración de las sustancias citotóxicas como la lipofuscina y así frenar, o

al menos disminuir, la degeneración de la retina. Algunos de ellos son la ALK-100, la isotretinoína, VM200 (un secuestrador de aldehídos), Emixustat (inhibidor de RPE65), A1120 (inhibidor de la RBP4). Los modificadores del ciclo visual podrían ser una buena opción terapéutica que está actualmente en estudio.¹⁵

Otra alternativa moderna es el trasplante de células progenitoras de la retina (Figura 8) o simplemente células madre pluripotenciales en el ojo para intentar repoblar las células pigmentarias perdidas. Existen estudios (Astellas Institute for Regenerative Medicine. 2011), que prueban el beneficio de dichos procedimientos en cuanto a agudeza visual en pacientes con degeneración retiniana avanzada. Las complicaciones en cuanto a posible degeneración tumoral o rechazo del injerto se han demostrado mínimas y ahora se estudia la posibilidad de utilizar este tipo de procedimientos en pacientes en estadios más precoces de la enfermedad con el fin de reducir los tratamientos inmunosupresores post-trasplante.¹⁶

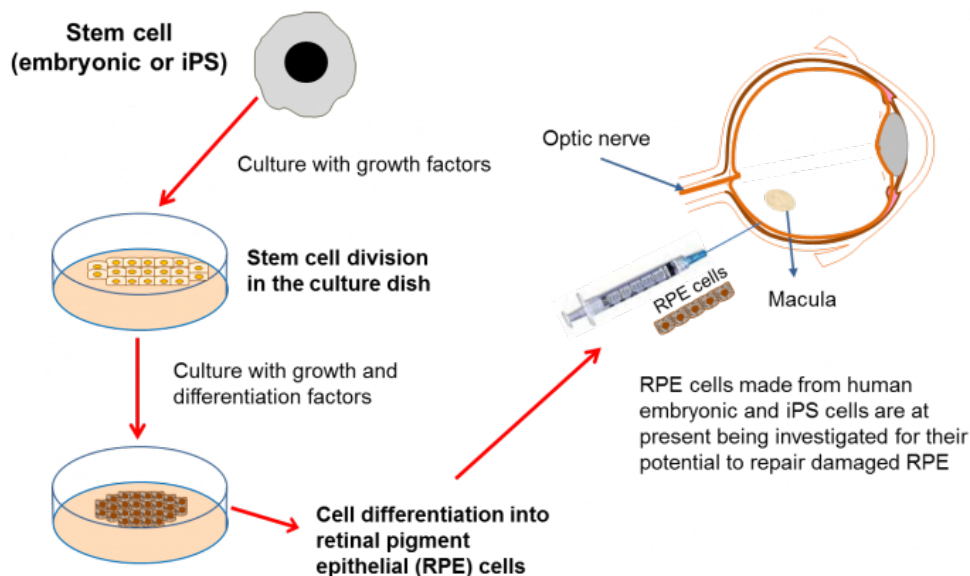


Figura 8. Trasplante de células progenitoras a células epiteliales pigmentarias en la retina. Las células progenitoras se cultivan con factores de crecimiento y posteriormente de la diferenciación a epitelio pigmentario retiniano son inyectadas en la retina. Tomado de Eurostemcell. [8]

También existe un planteamiento terapéutico aplicado hoy en día que es la rehabilitación de la visión a través de diferentes sistemas electrónicos para ayudar a la baja visión. Estos sistemas precisan de un tiempo de adaptación y entrenamiento y pueden ir cambiando conforme se desarrolla la edad. Un ejemplo de esto es el implante de dispositivos electrónicos y prótesis retinianas. El fundamento de esta técnica reside en el implante de un array con electrodos conectado a una cámara externa o a otro dispositivo que capte las imágenes. Este implante estimulará las neuronas retinianas con el objetivo de transmitir la señal lumínica y espacial a través de la vía óptica (Figura 9). Existen varios tipos de implantes según su localización en la epiretina, subretina, subcoroidales o incluso en el nervio óptico.^{14,17}

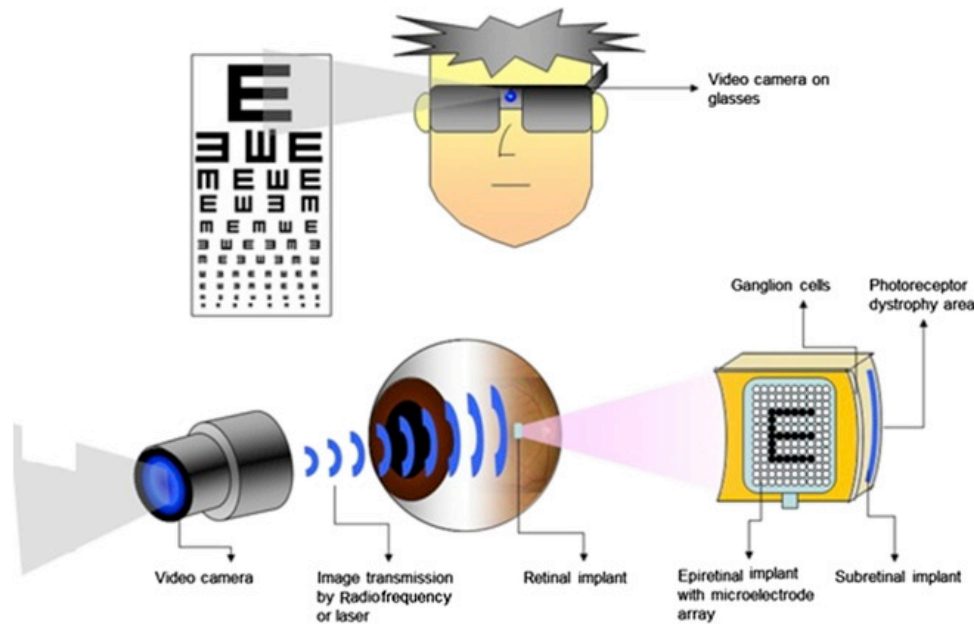


Figura 9. Prótesis retiniana. En la figura se ejemplifica como la luz exterior captada por un dispositivo receptor como una cámara envía la información recogida hasta el array implantado en la retina. Tomado de *Journal of the Chinese Medical Association*. [9]

4. TERAPIA GÉNICA

4.1. Introducción a la terapia génica

La terapia génica surge en los años 80 con el fin de tratar diferentes enfermedades a través de la modificación genética de las células de los tejidos afectados, contrarrestando así el déficit o el exceso de función. Las células utilizadas en estos tratamientos pueden ser germinales o somáticas. La modificación genética de células somáticas afectará a los tejidos del paciente pero no a su descendencia, mientras que la modificación de células germinales conlleva un cambio tanto en el sujeto como en su descendencia. Esto lleva consigo mucha controversia y acarrea una larga discusión ética consigo, por ello actualmente solo está permitida la terapia génica sobre células somáticas.

Para acceder al tejido diana tenemos dos métodos posibles, por una parte está el método *ex vivo*, y por otra el método *in vivo* (Figura 10). El método *ex vivo* consiste en introducirse en el tejido y extraer una muestra de las células de este. Dichas células se modifican genéticamente y se amplificarán *in vitro* para posteriormente ser reintroducidas en el tejido receptor. La forma *in vivo*, en cambio, trata las células directamente en el tejido sin necesidad de extraer una muestra celular previamente.

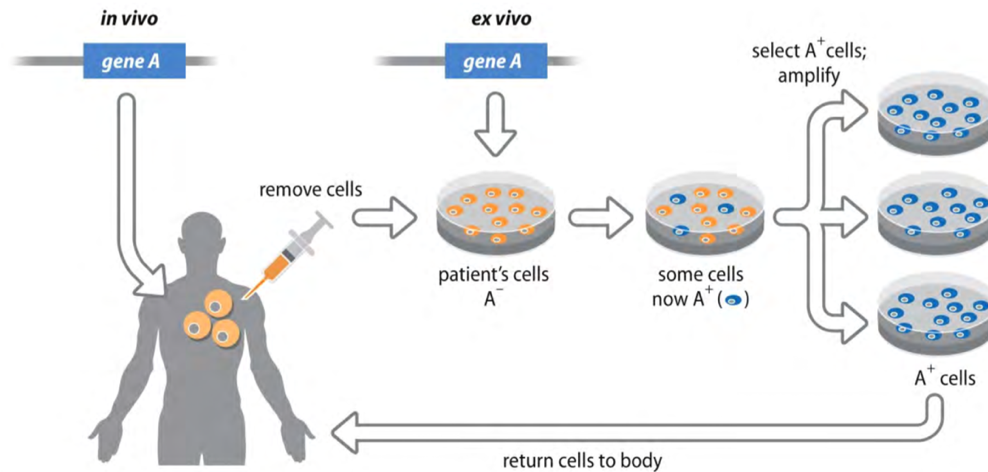


Figura 10. Terapia génica. Las dos vías para la terapia génica son la terapia *in vivo* dentro del organismo y la *ex vivo*, que toma células del paciente e introduce el gen defectivo en ellas, las amplía y se reinoculan en el organismo. Tomado de *Genetics and Genomics in Medicine* de Garland Science. [10]

Para introducir el material genético *in vivo* en el tejido diana se necesitarán vectores que lo porten. Los vectores son el vehículo hasta la célula, y existen distintos tipos según el tejido y el material genético que se quiera introducir en él. Los hay no virales como son los liposomas, el ADN desnudo o los complejos ADN-proteínas y por otra parte están los virales. Los vectores virales son virus atenuados sin poder infeccioso que conservan la capacidad de introducir el material genético que portan en la célula (Figura 11). Los vectores no-virales son mejores a nivel de bioseguridad, pero son menos eficientes y por tanto se suelen utilizar los virales.

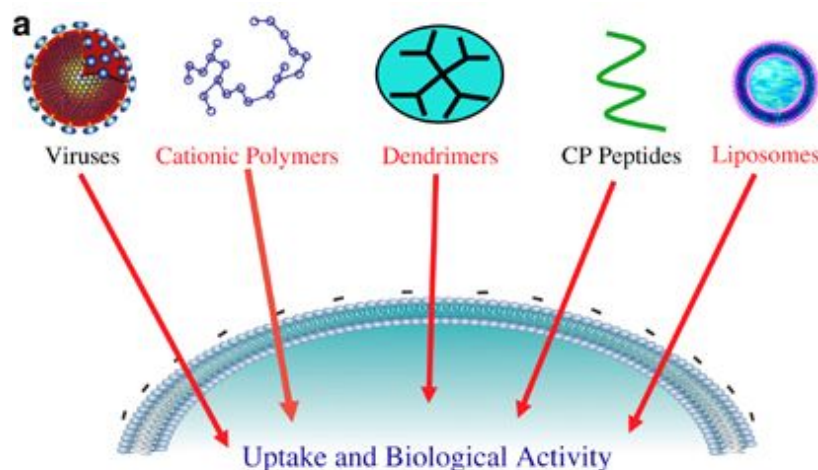


Figura 11. Distintos tipos de Vectores utilizados en terapia génica. Tomado de *Nature* [11]

Muchos autores consideran que dentro de los vectores virales los mejores son los adenovirus, adeno-asociados y los lentivirus. También existe otro grupo, los Retrovirus, que son ampliamente utilizados en terapia génica debido a su capacidad para integrarse en el genoma de la célula huésped y por tanto de aportar una permanencia mucho mayor del efecto (Figura 12).

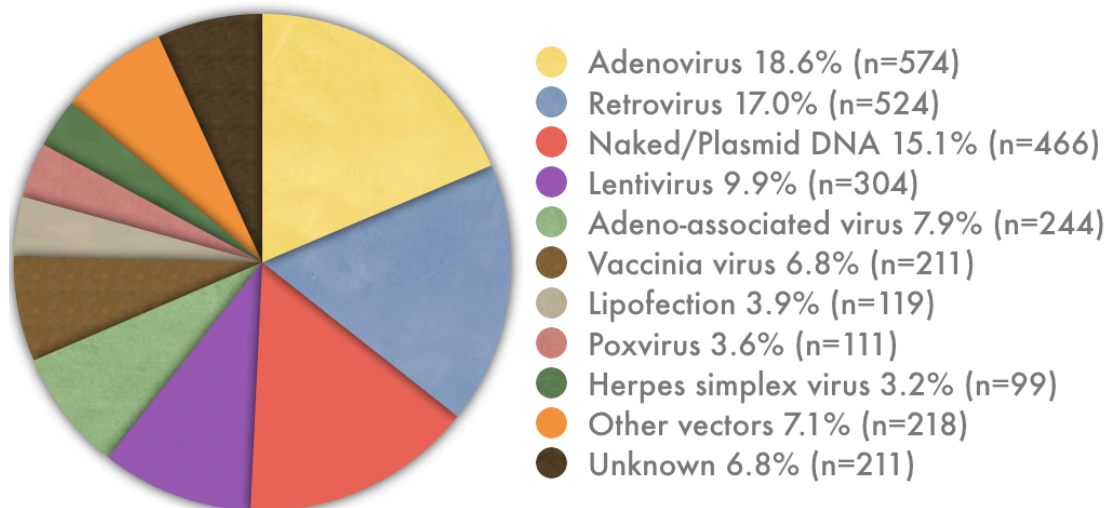


Figura 12. Vectores utilizados en los ensayos clínicos sobre terapia génica. Tomado de *The Journal of Gene Medicine*. [12]

Los primeros ensayos clínicos con terapia génica se llevaron a cabo sobre la inmunodeficiencia combinada severa causada por la deficiencia del enzima adenosín deaminasa. Estos experimentos se realizaron a través de la transducción *ex vivo* del material genético necesario para codificar la proteína a células hematopoyéticas.¹⁸

En 1999 se produjo gran revuelo en torno a al caso de Jesse Gelsinger, un estadounidense de 17 años que murió al participar en un ensayo clínico con terapia génica. Jesse padecía un déficit de ornitina decarboxilasa, un enzima esencial en el ciclo de la urea cuyo déficit produce la acumulación masiva de amoniaco en el organismo. Hasta entonces el único método de supervivencia era la detección precoz al nacimiento y el seguimiento de una dieta estricta carente de proteínas de por vida. Este fue el caso de Jesse, que con un control exhaustivo de su dieta llegó hasta los 17 años de edad. Jesse decidió participar en el ensayo clínico con el fin de ayudar a recién nacidos con su misma deficiencia. Fue el último sujeto del estudio en ser tratado y al que mayor cantidad se le inyectó en la vena hepática con el adenovirus correspondiente. Al día siguiente Jesse padecía ictericia grave, hiperamoniemia y fallo multiorgánico que le ocasionó la muerte. Este caso conllevó a la parada del estudio y un enorme revuelo mediático y científico ya que se descubrieron una serie de datos alarmantes como conflictos de intereses entre los investigadores de la Universidad de Pennsylvania y una empresa de biotecnología, deficiencias en la comunicación de los riesgos del tratamiento, ocultación de datos del tratamiento

en animales (tres de los monos empleados murieron) y del tratamiento anterior en otros pacientes (sufrieron daño hepático). Este caso supuso un conflicto que cambió las políticas de bioética en cuanto a las terapias génicas.¹⁹

Otra alternativa emergente es el tratamiento in vivo para reemplazar alelos mutados en cromosomas concretos a través de “**cirugía genética**”. Este proceso consiste en la utilización de unos complejos moleculares llamados CRISPR-Cas derivados de células procariotas. Las proteínas Cas son las denominadas “tijeras moleculares” o “enzimas quirúrgicos” (Figura 13), capaces de cortar y pegar fragmentos de ADN de todo tipo de tamaños. Las secuencias CRISPR, por su parte, son una especie de “GPS molecular” que guía a las moléculas Cas hasta el lugar concreto del genoma que se va a editar a través de ARNs guía. Los científicos investigadores han sido capaces de programar estas moléculas para que actúen en zonas concretas y corten y reemplacen alelos mutados en diferentes cromosomas para sustituirlos por material genético normo-funcional.

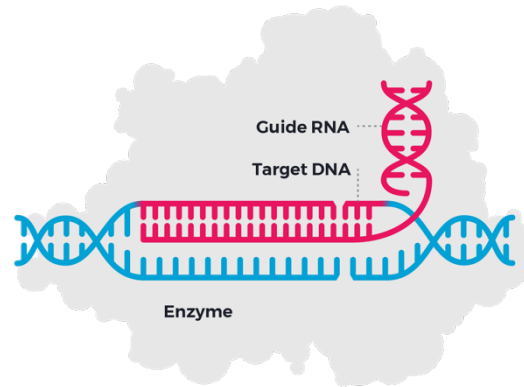


Figura 13. Proteína Cas9. El RNA guía identifica el gen diana y el enzima Cas9 lo corta y reemplaza. Tomado de Editas Medicine. [13]

En los primeros experimentos se utilizó la molécula Cas9 derivada de *Streptococcus pyogenes*. Más adelante se utilizaron moléculas Cas9 más pequeñas derivadas de *Staphylococcus aureus* y de *Campylobacter jejuni*. En oftalmología este método ha probado su efectividad en modelos animales con un alelo dominante negativo en el gen de la rodopsina. A pesar de que teóricamente puede parecer un método ideal, conlleva varias dificultades técnicas como tener que crear ARNs guía muy específicos para mutaciones de algunos genes, así como consideraciones éticas, ya que estamos hablando de una técnica con efectos irreversibles y potencialmente indeseados que pueden ser utilizados de manera errónea con consecuencias catastróficas.^{5,20}

4.2. Terapia génica en las retinopatías congénitas

El ojo, y en concreto la retina, es uno de los mejores órganos diana para la terapia génica por una serie de razones. Lo primero es la gran accesibilidad a través de la pars plana del ojo para la inyección de los vectores (Figura 14). Luego, la organización en capas de la retina permite una terapia dirigida a según qué población celular nos interese, en nuestro caso concreto, la inyección subretiniana nos dará acceso a la capa más externa formada por los fotorreceptores. Además el encapsulamiento ocular gracias a la barrera hemato-retiniana permite que los vectores se conserven en la zona de inyección y no se diseminen, lo cual disminuye notablemente los posibles efectos adversos inmunológicos del procedimiento. Por otra parte, el tejido retiniano concentra una pequeña población celular en comparación con otros tejidos y órganos, lo que permite que la terapia sea eficiente y orientada a esta población sin necesidad

de grandes dosis de medicamento. Por último, de cara a los resultados terapéuticos el ojo nos ofrece una ventaja, la fácil monitorización de su función gracias a las pruebas de agudeza visual y la electroretinografía ⁴

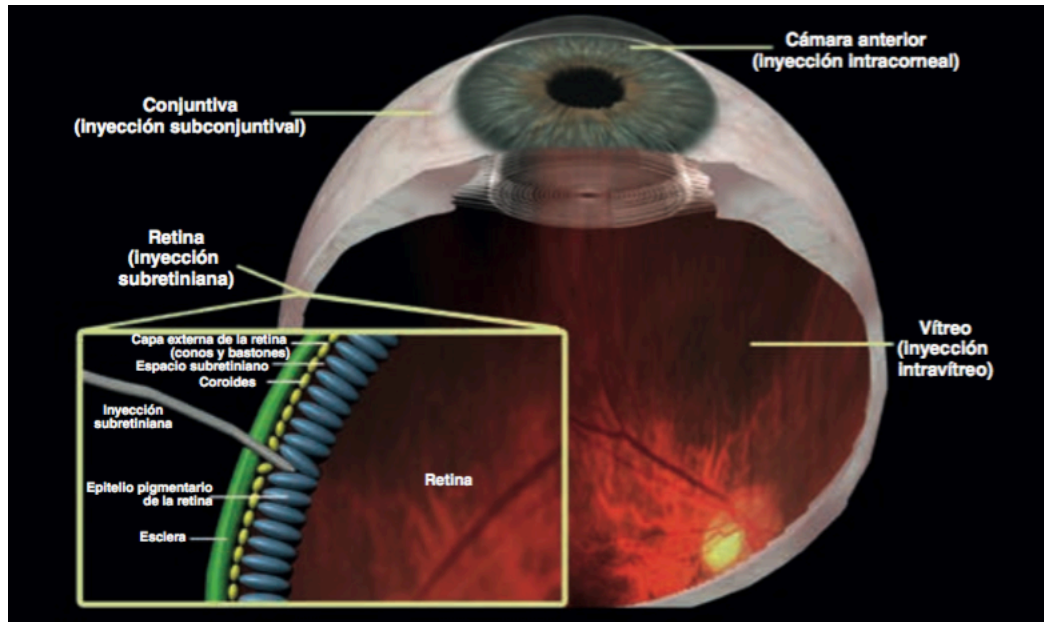


Figura 14. Vías de inyección intraocular para vectores virales. Tomado de la *Gaceta médica de México*. [14]

4.2.1. Vectores utilizados

Para llevar a cabo terapia génica en el ojo, los vectores virales son de elección, de entre ellos destacan los asociados a adenovirus (AAV), los adenovirus y los lentivirus.

Los **virus asociados a adenovirus** son virus de cadena simple de ADN con una gran capacidad para que el material genético permanezca en el tejido durante un largo periodo produciendo muy poca inmunogenicidad. Una de las limitaciones de los AAV es su capacidad, los tradicionales solamente pueden transducir entre 4 y 5kb frente a los nuevos serotipos duales que son capaces de empaquetar una cantidad amplia de hasta 8.4kb subdividida en varios vectores, con lo que se puede introducir genes grandes como los alterados en la enfermedad de Stargardt. Otra solución podría ser la creación de los denominados “minigenes”, genes truncados con la misma capacidad funcional que los originales. Los virus AVV2, que mantienen una transducción del material genético sostenida en el 50% de los fotorreceptores y por tanto una probable acción prolongada, han demostrado seguridad y eficacia en inyección subretiniana para tratar la Amaurosis congénita de Leber. Otros modelos como el AVV5, AVV8 y AVV9 han demostrado un inicio más rápido de su acción.

Los **lentivirus**, de la familia de los retrovirus, tienen envoltura lipídica y doble cadena de ARN capaces de introducir el material genético en el genoma de la célula huésped a través de una enzima retrotranscriptasa y una integrasa. Los lentivirus son derivados de virus como el VIH-1 o del virus de anemia infecciosa equina (EIAV), el cual no es patogénico en seres humanos. Estos últimos han demostrado mayor eficiencia en las células fotorreceptoras y por tanto han sido los más utilizados dentro de este grupo para tratar las enfermedades de la retina. La capacidad de los lentivirus se encuentra más o menos entre la de los Adenovirus y los AAV, con un máximo de entre 8 y 9kb.

Por su parte los **adenovirus** son virus de doble cadena de ADN de corta vida pero con una gran capacidad de inserto (entre 30 y 40kb). Su principal desventaja radica en su alta inmunogenicidad, ya que los adenovirus son patógenos muy comunes entre los humanos y la mayoría tenemos desarrollada inmunidad frente a ellos y por tanto anticuerpos que los neutralizan. Además tienen dificultades para alcanzar algunos tipos celulares de la retina y conseguir efectos a largo plazo. Se han utilizado en modelos animales para inhibir la neovascularización y eliminar células tumorales como las del retinoblastoma, pero no han sido de gran utilidad en las retinopatías.^{4,5,21}

Tabla 2. Diferencias entre los principales vectores utilizados en terapia génica.

Vector	Potencial inmunológico	Tropismo	Inserto	Principal ventaja
<u>Adenovirus</u>	Alta	Células diferenciadas	30-40kb	Transducción eficiente en la mayoría de células
<u>Lentivirus</u>	Baja	Células en división y diferenciadas	8-9kb	Expresión genética de larga duración
<u>AAV</u>	Baja	Células en división y diferenciadas	4-5kb	No inflamatorio ni patógeno

4.2.2. Amaurosis congénita de Leber

En 2001 se realizó el primer estudio con terapia génica sobre fotorreceptores. El estudio se llevó a cabo con ratones Rds con mutaciones nulas en el gen Pdp2 que codifica la periferina 2 y se les puso una inyección subretiniana con AAV2

que portaba el gen defectivo de origen murino. La proteína se empezó a producir por las células fotorreceptoras y esto se tradujo en una recuperación en el electroretinograma a pesar de que el efecto fue limitado en el tiempo. Este estudio fue seguido de la primera transducción efectiva del gen RPE65. Esto fue llevado a cabo en el perro de raza Briard que padece una delección de cuatro pares de bases en dicho gen. Con una sola inyección subretiniana de AAV2 portador del gen a los 4 meses de edad se registró una mejoría en los electroretinogramas, potenciales evocados visuales y respuesta pupilar de los animales. Este efecto solo se observó en los perros que tenían disfunción sin degeneración retiniana, lo cual evidenció la importancia de la ventana terapéutica.

Estos resultados positivos llevaron al lanzamiento de los tres primeros ensayos clínicos sobre terapia génica retiniana en humanos. El primer estudio (Maguire, et al. 2009) se llevó a cabo para probar la eficacia y seguridad de la técnica en tres pacientes con **LCA2** de entre 19 y 23 años de edad. A estos pacientes se les inyectó cDNA de RPE65 a través de una inyección subretiniana de vectores AVV en su ojo derecho mientras que el izquierdo se utilizó como control. Se registraron medidas objetivas del reflejo pupilar o el test de nistagmo, y también otras como subjetivas a través de exámenes de agudeza visual, campos visuales de Goldmann y un examen que evalúa la capacidad para caminar en un cuarto poco iluminado y con obstáculos. Todas estas pruebas se realizaron tanto antes como un mes después de la intervención.

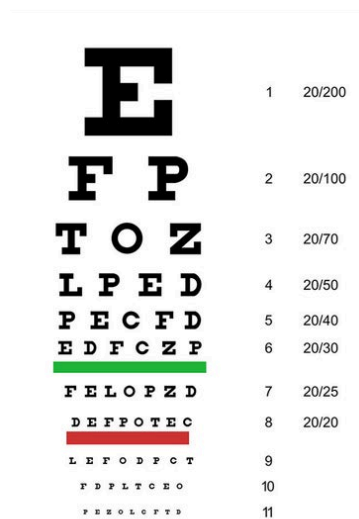


Figura 15. Cartilla de Snellen. Tomado de biomedicos.co [15]

Se observó una conducción electroretinográfica de alrededor del triple respecto de la medida basal tomada antes de la inyección así como una disminución de la frecuencia del nistagmo en los 3 ojos tratados. De las pruebas subjetivas, la agudeza visual mejoró en los tres pacientes. Se describió una mejoría a la hora de leer la cartilla de Snellen (Figura 15). Los pacientes 1 y 2 pasaron de no reconocer ninguna letra a mejorar a 20/1050 (aproximadamente dos líneas) uno y a 20/710 el otro (más de 4,5 líneas), mientras que el paciente 3 que partía de una agudeza de base de 20/640, mejoró a 20/290 (más de 3,5 líneas). En el estudio basal caminando en un cuarto con poca iluminación y obstáculos, los pacientes colisionaron antes del ensayo con la mayoría de los 14 obstáculos y perdieron la dirección en múltiples ocasiones. Tras la inyección el paciente 2 fue capaz de completar el circuito sin desviarse.

Tras un año y medio de seguimiento se finalizó el estudio de seguridad y eficacia en los 3 pacientes. Durante este periodo no se demostró ninguna respuesta inmunológica adversa y los parámetros objetivos (reflejo pupilar y disminución del nistagmo) alcanzaron picos que se mantuvieron estables hasta el final del estudio. La agudeza visual continuó mejorando con el paso del tiempo en cada examen realizado y en el test con obstáculos también se objetivó mejoría aunque esta fue escasa.

En un estudio de seguimiento (Testa et al. 2010) entre los que se encontraban los 3 pacientes de la cohorte anterior (Maguire), se describió una clara mejoría de la agudeza visual entre la medida basal y 3 años después en el ojo tratado en comparación al control. El pico máximo de agudeza visual fue observado a los 6 meses en tres pacientes y a los 18 en otro. Estos picos se mantuvieron estables hasta el final de los tres años de seguimiento. El otro paciente padeció un agujero macular como consecuencia de la inyección pero su agudeza visual también mejoró y se mantuvo estable. El campo visual también se describió aumentado, alcanzando su pico máximo en el día 60 para 4 pacientes y en el día 180 para el 5°. En todos se objetivó mejora del reflejo pupilar (Figura 16) y la disminución en la frecuencia del nistagmo entre ambos ojos. Estos resultados se mantuvieron estables durante todo el seguimiento de los pacientes.

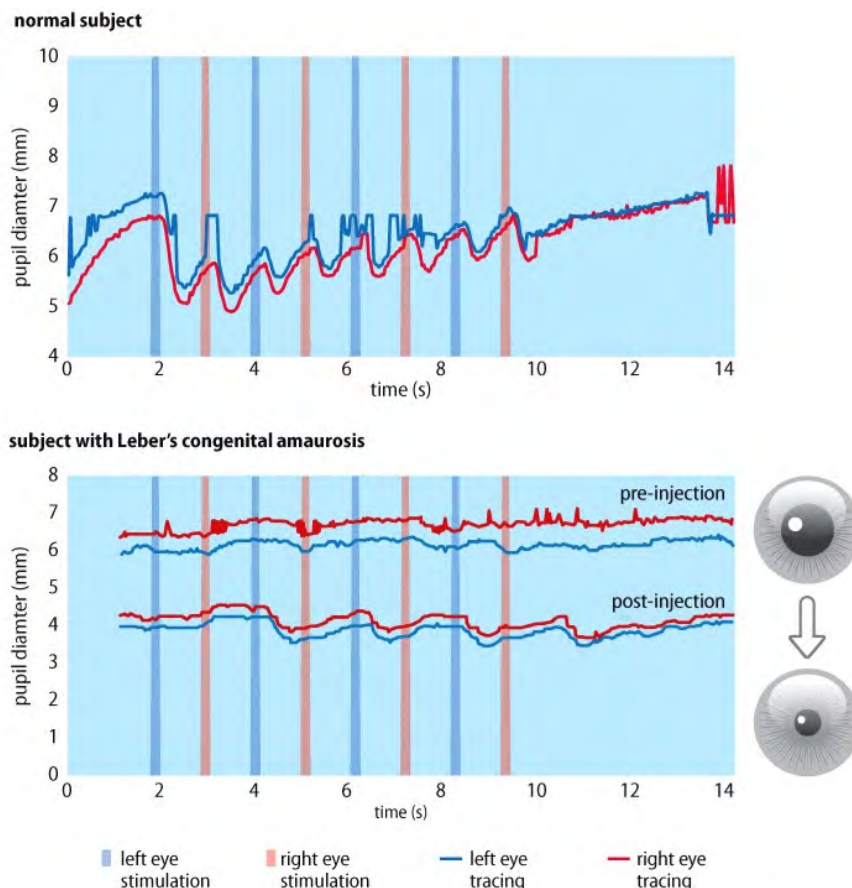


Figura 16. Efecto de la terapia génica en el reflejo pupilar en la LCA. En la figura se muestra un registro del reflejo pupilar en un sujeto normal frente a un paciente con LCA pre y post inyección. Tomado de Spark Therapeutics. [16]

Al mismo tiempo se llevó a cabo otro estudio (Bainbridge et al. 2010) en tres pacientes de entre 17 y 23 años de edad con RPE65 mutado. En este estudio se utilizó en cada paciente el ojo con peor agudeza visual y el contralateral como control. Se demostró seguridad y eficacia en uno de los pacientes, con mejoría en la visión medida por microperimetría a la adaptación a la oscuridad y test caminando por un espacio poco iluminado.

En el último estudio de los tres mencionados como pioneros (Hauswirth et al. 2009) se realizó un seguimiento de 90 días tras la inyección en tres pacientes y se demostró un incremento significativo en la sensibilidad visual en condiciones de poca iluminación ambiental.^{5,22}

Otro estudio en el hospital infantil de Philadelphia (Spark Therapeutics 2010) en el que se inyectó el vector AVV2 con el gen RPE65 en el ojo contralateral a los pacientes que fueron tratados con esta misma terapia en el primer ojo, objetivó los mismos resultados positivos implementando la mejoría al campo visual completo. Este estudio fue importante porque demostró que la previa inyección del virus en el otro ojo no había desencadenado una respuesta inmune adaptativa que interfiriese con el efecto de la reinyección contralateral años más tarde.²³

En 2013 la compañía farmacéutica Spark Therapeutics comenzó el ensayo clínico de fase III. Este fue un ensayo abierto, aleatorizado y controlado en el que participaron 31 sujetos, 13 hombres y 18 mujeres. La edad media fue de 15 años (rango de 4 a 44 años), incluyendo 20 pacientes pediátricos de edad de 4 a 17 años y 11 pacientes adultos. 21 sujetos fueron aleatorizados para recibir la inyección subretiniana. La agudeza visual media en el primer ojo de este grupo al inicio del estudio fue 1,18 con una desviación típica de 0,14. 10 sujetos fueron asignados al azar al grupo de control sin intervención. La agudeza visual media en el primer ojo de este segundo grupo al inicio del estudio fue de 1,29 con una desviación típica de 0,21. En cada grupo un sujeto abandonó antes de realizarse la intervención. Los 9 sujetos asignados al grupo de control se cruzaron tras un año de observación para recibir la inyección. La variable principal del estudio fue la medición del valor de la prueba de movilidad multiluminiscente bilateral (MLMT) basal frente a después de un año entre los dos grupos. La prueba consiste en recorrer un circuito con 7 niveles diferentes de iluminación desde 400lux (una oficina bien iluminada) hasta 1lux (una noche de verano sin luna). También se estudiaron tres variables secundarias: prueba del umbral de sensibilidad a la luz de campo completo usando luz blanca, el cambio de puntuación en la MLMT (puntuación para pasar la prueba $\leq 0,25$) para el primer ojo asignado y pruebas de agudeza visual.

Tabla 3. Cambios en la puntuación de la MLMT: año 1 en comparación con el valor basal.

Cambios en la puntuación de la MLMT	Diferencia Intervención-Control (95% IC)	Valor p
usando la visión binocular	1,6 (0.72, 2.41)	0,001
usando solo el primer ojo asignado	1,7 (0.89, 2.52)	0,001
usando solo el segundo ojo asignado	2,0 (1.14, 2.85)	< 0,001

La puntuación de la MLMT monocular mejoró significativamente en el grupo de tratamiento y fue similar a los resultados de la MLMT binocular. Esta y el resto de variables secundarias obtuvieron un efecto positivo y se mantuvieron durante 3 años en el grupo de tratamiento y desde de cruzarse en el grupo de control.

Finalmente en 2018 el comité de la FDA (Food and Drug Administration) aprueba el voretigene neparvovec-rzyl bajo el nombre comercial de Luxturna de Spark Therapeutics. Luxturna se convierte así en la primera terapia génica aprobada y el primer tratamiento farmacológico en utilizar AVV en Estados Unidos. Al año siguiente, en 2018, la EMA (Agencia Europea de Medicamentos) aprueba Luxturna en Europa. ²⁴

Luxturna puede ser dispensado únicamente por receta medica y administrado por un cirujano experimentado en cirugía ocular. Los pacientes reciben una dosis única de $1,5 \times 10^{11}$ vg diluido en 0,3ml en cada ojo con una diferencia mínima de 6 días entre ambos. Se recomienda una pauta inmunomoduladora desde 3 días antes de la intervención y hasta 14 días después.

Tabla 4. Pauta inmunomoduladora pre y postoperatoria para cada ojo.

Preoperatorio	3 días antes de la administración de Luxturna	Prednisona (o equivalente) 1 mg/kg/día (hasta un máximo de 40 mg/día)
Postoperatorio	4 días (incluyendo el día de la administración)	Prednisona (o equivalente) 1 mg/kg/día (hasta un máximo de 40 mg/día)
	Continuar 5 días	Prednisona (o equivalente) 0,5 mg/kg/día (hasta un máximo de 20 mg/día)
	Continuar 5 días con una dosis cada dos días	Prednisona (o equivalente) 0,5 mg/kg cada dos días (hasta un máximo de 20 mg/día)

El paciente debe ser examinado minuciosamente antes de iniciarse la pauta inmunomoduladora y de la intervención. En el caso de presentar patología infecciosa activa de cualquier naturaleza se debe esperar a que se haya recuperado. Antes de la intervención la pupila debe ser dilatada y se debe administrar antibiótico de amplio espectro en colirio.

El sitio de inyección recomendado se sitúa a lo largo de la arcada vascular superior, al menos a 2 mm de distancia del centro de la fóvea (Figura 17).

Durante el postoperatorio se debe colocar la cabeza en posición supina y mantener así durante 24 horas tras el alta. La eliminación del vector se produce a través de las lágrimas del paciente, así que se ha de tener cuidado con los productos de deshecho en

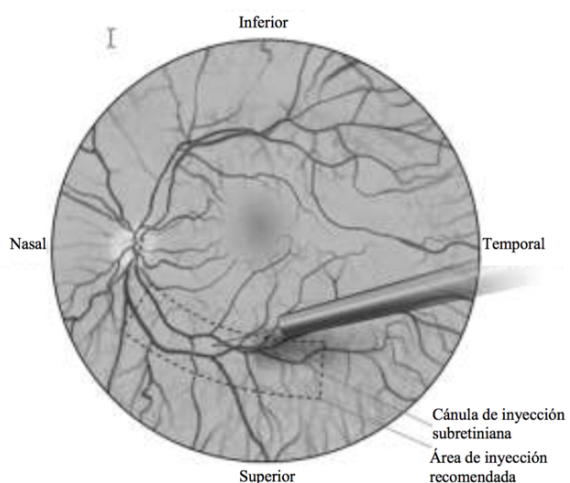


Figura 17. Punta de la cánula de inyección subretiniana colocada en el sitio de inyección recomendado. Tomado de Spark Therapeutics. [17]

contacto con las lágrimas al menos durante los primeros 14 días. Durante las primeras semanas de postoperatorio se pueden experimentar alteraciones visuales transitorias como visión borrosa o fotofobia.

Las reacciones adversas más frecuentes, con una incidencia de más del 5%, fueron hiperemia conjuntival, cataratas, aumento de la presión intraocular, desgarro retiniano, agujero macular, depósitos subretinianos, inflamación ocular, irritación ocular, dolor ocular y maculopatía.^{24,25}

Tabla 5. Reacciones adversas relacionadas con Luxturna.

Sistema de clasificación de órganos / Frecuencia	Reacciones adversas
Trastornos oculares	
Frecuentes	Depósitos en la retina

Tabla 6. Reacciones adversas relacionadas con el procedimiento de administración.

Sistema de clasificación de órganos / Frecuencia	Reacciones adversas
Trastornos psiquiátricos	
Frecuentes	Ansiedad
Trastornos del sistema nervioso	
Frecuentes	Cefalea, mareo
Trastornos oculares	
Muy frecuentes	Hiperemia conjuntival, cataratas
Frecuentes	Desgarro retiniano, dellen, agujero macular, inflamación ocular, irritación ocular, dolor ocular, maculopatía, hemorragia corooidal, quiste conjuntival, alteración ocular, hinchazón ocular, sensación de cuerpo extraño en los ojos, degeneración macular, endoftalmítis, desprendimiento de retina, alteración de la retina, hemorragia retiniana.
Trastornos gastrointestinales	
Frecuentes	Náuseas, vómitos, dolor abdominal superior, dolor en los labios
Trastornos de la piel y del tejido subcutáneo	
Frecuentes	Erupción cutánea, hinchazón de la cara
Exploraciones complementarias	
Muy frecuentes	Incremento de la presión intraocular
Frecuentes	Inversión de la onda T en el electrocardiograma
Lesiones traumáticas, intoxicaciones y complicaciones de procedimientos terapéuticos	
Frecuentes	Complicación de la intubación endotraqueal, dehiscencia de heridas

En el campo de la **LCA1**, se han realizado experimentos con inyección subretiniana de AAV2, AAV5 y AAV8 portadores del gen GUCY2D sano en ratones (Sharon et. al 2018) obteniéndose resultados prometedores en cuanto a mejora en la agudeza visual en los conos. Dichos resultados y su permanencia en el tiempo hacen más que evidente la posible aplicación de estos métodos en seres humanos. A pesar de ello, ningún ensayo clínico se ha desarrollado aún en este campo en humanos.

El gen CEP290 mutado, responsable de la **LCA10**, ha sido otra diana para los experimentos en ingeniería genética. Este gen, de alrededor de 8kb, es demasiado grande para la capacidad de los AAV y por tanto se han utilizado lentivirus para su transducción con éxito tanto *in vivo* como *in vitro*. Las nuevas técnicas han creado un minigen funcional lo suficientemente pequeño para los AAV 2/8 que ha demostrado su efectividad en ratones. A pesar de lo anterior, el gen CEP290, y en concreto su mutación más frecuente denominada IVS26, han sido la principal línea de investigación de cirugía genética a través del sistema CRISPR-Cas. El método se basa en la utilización de vectores AAV5 que se introducen el spCas9 y un par de RNAs guía que permiten el corte de la secuencia exacta y la posterior reparación del ADN. Este proceso se puso a prueba en un ensayo clínico (Ruan et al. 2017) que demostró su efectividad en ratones y además detectó la autodestrucción del plásmido spCas9, minimizando así la posible respuesta inmunológica frente al material genético bacteriano.^{5,22}

En 2019 la compañía Editas medicine realizó ensayos para reparar el gen CEP290 con su nuevo fármaco **EDIT-101** (Figura 18) en explantes de retina humana para verificar los resultados obtenidos en modelos animales. Tras esto comenzaron junto con la compañía Allergan ensayos de fase I/II multicéntricos y de escalamiento de dosis para comprobar la seguridad, tolerancia y efectividad de EDIT-101 en alrededor de 18 pacientes de 3 o más años de edad. Este ensayo es el primero en realizarse *in vivo* con un medicamento CRISPR en humanos (ver 4.1).^{26,27}

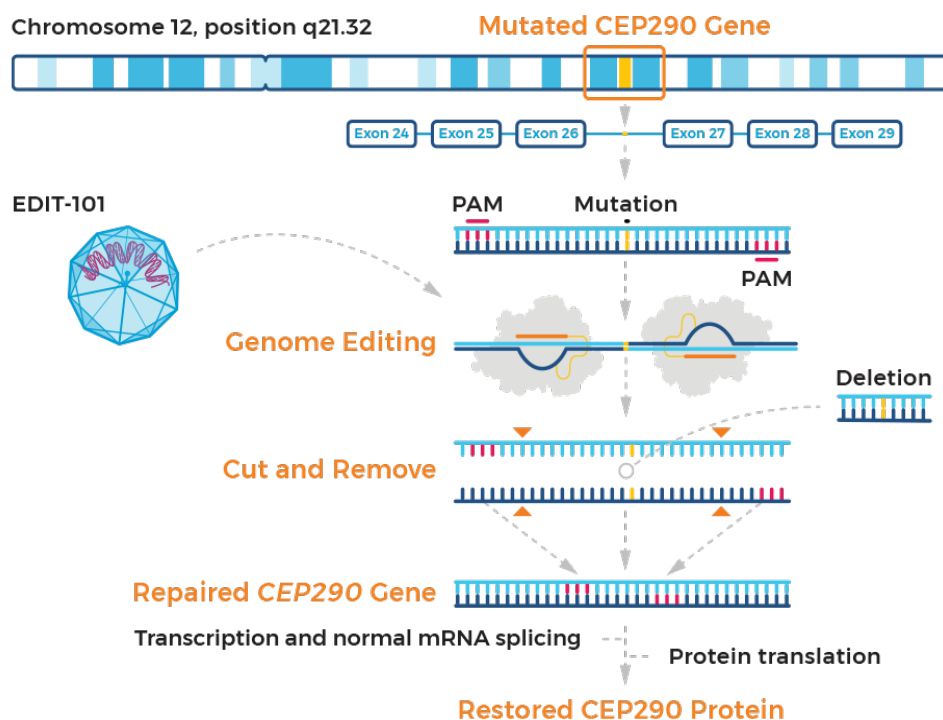


Figura 18. EDIT-101. EDIT-101 encuentra la mutación del gen CEP290 en el cromosoma 12 y gracias a la Cas9 y los RNA guía, corta y elimina el gen mutado y posteriormente lo repara, tras esto la traducción de la proteína defectiva pasa a ser normal. Tomado de Editas Medicine. [13]

4.2.3. Enfermedad de Stargardt

Sobre la enfermedad de Stargardt se han realizados estudios con animales utilizando letivirus (EIAV) o AAV duales que contienen el gen ABCA4 (~7kb de tamaño). Estos estudios demostraron una disminución de los acúmulos de lipofusina en las células fotorreceptoras. Además la degeneración de fotorreceptores relacionada a la insuficiencia del gen ABCA4 es tardía, lo cual ofrece una amplia ventana terapéutica. Basándose en estas premisas se han iniciado dos ensayos clínicos de fase I/IIa concomitantes utilizando Stargen de la compañía Sanofi, un tratamiento basado en la inyección subretiniana de lentivirus que portan el gen ABCA4 nativo. El primer estudio se inició en 2011 con 27 pacientes para probar 3 dosis distintas, este estudio sigue en curso a día de hoy. El segundo se inició en diciembre de 2012 para realizar un seguimiento en seguridad y eficacia a 46 pacientes hasta 2034.^{5,22,28,29}

Una nueva estrategia se desarrolló en 2012 con el fin de solucionar los problemas del tamaño del gen ABCA4. Se propuso utilizar nanopartículas como vectores en vez de virus. En ensayos con ratones y nanopartículas se demostró que 8 meses tras la inyección se seguía expresando el gen con normalidad y esto se tradujo en una mejora en la recuperación visual tras la exposición a la oscuridad y una reducción del acúmulo de gránulos de lipofusina.³⁰

Las nanopartículas también se han utilizado en la enfermedad de Stargardt como vector capaz de mantener una infusión constante y controlada de retinilamina a largo plazo tras inyección subcutánea. La retinilamina es un derivado de las aminas retinoides capaz de reducir el acúmulo de at-RAL (un precursor de la rodopsina) de dos maneras diferentes, la primera es su acción como secuestrador que degrada dichos acúmulos y la segunda es como inhibidor de RPE65 (Figura 19). Este método ya ha sido probado con seguridad en ratones.³¹

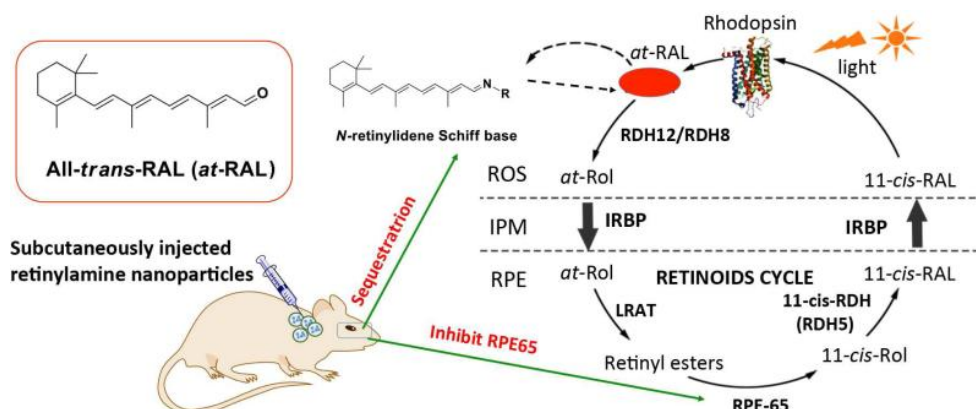


Figura 19. Inyección de retinilamina en ratones. La inyección subcutánea de retinilamina mantiene una infusión duradera en el ojo secuestrando los acúmulos de at-RAL e inhibiendo la RPE65. Tomado de Puntel A. [18]

4.2.4. Retinitis Pigmentaria

Como ya ha sido comentado, la retinitis pigmentaria puede ser causada por diversas mutaciones. Una de ellas es la deficiencia del gen MERTK. Este gen produce la Mertirosin quinasa, un receptor crucial en la fagocitosis de los segmentos externos de la membrana externa de los fotorreceptores. La mutación, que se transmite de forma autosómica recesiva, imposibilita el reciclaje de estos segmentos, lo que conlleva la degeneración y pérdida de los fotorreceptores. Se han llevado a cabo una serie de ensayos clínicos exitosos sobre ratas con dicha mutación y la inyección de vectores AAV para suplementarla. En 2011 el King Khaled Eye Specialist Hospital de Arabia Saudita comenzó un estudio de fase I con AAV2 que expresan el gen humano MERTK en pacientes con déficit de este gen. 6 pacientes de entre 14 y 54 años fueron incluidos en el estudio. Se les administró una inyección submacular con el vector en el ojo con peor agudeza visual de cada paciente. Dos pacientes recibieron una dosis de 150 μ L y los otros cuatro una de 450 μ L. Se les realizó un seguimiento diario durante los 10 primeros días y luego en los días 30, 60, 90, 180, 270, 365, 540 y 730 post-inyección. Ninguno de los pacientes desarrolló complicaciones oculares ni sistémicas atribuibles al procedimiento. Uno desarrolló una queratitis y dos cataratas progresivas. Además se observó un aumento en los anticuerpos contra AAV en dos de los pacientes pero no se detectó el virus por PCR.^{5,32}

Otra de las causas de retinitis pigmentaria es la mutación ligada al cromosoma X en el gen RPGR que codifica la subunidad delta de la cGMP fosfodiesterasa de los bastones. Esta mutación afecta aproximadamente a 1 de cada 3500 personas produciendo una alteración en los cilios de los fotorreceptores que no se conoce con precisión. En torno a esta deficiencia se han realizado estudios con AAV2/5 portadores del gen RPGR humano inyectado en modelos caninos. Tras esto, dos ensayos clínicos de fase I/II en humanos comenzaron con el mismo método empleado en perros. Uno de estos estudios se trata de un ensayo clínico aleatorizado cuádruple ciego llevado a cabo con AAV8 en 63 pacientes para escalamiento de dosis. La fase I/II de este estudio comenzó en 2017 y hasta ahora ha demostrado seguridad y mejoría en la agudeza visual de los participantes a partir del primer mes tras la inyección mantenida hasta la actualidad.^{5,32,33}

4.2.5. Síndrome de Usher

Dentro del grupo de mutaciones que contempla el síndrome de Usher, una de ellas, la del gen MYO7A ha sido objeto de estudio dentro del campo de la terapia génica. El gen MYO7A tiene unas 100kb de tamaño. Esto dificulta su transducción mediante vectores AAV. Se realizaron estudios con éxito mediante la inyección subretiniana de del gen con vectores EIAV en ratones y después en macacos, lo que incentivó el primer ensayo de fase I/II con la inyección de EIAV-MYO7A (UshStat. 2019) en pacientes humanos con síndrome de Usher 1B. El estudio, llevado a cabo por la compañía Sanofi, se ha paralizado debido a la falta de fondos, pero se encuentra en fase de búsqueda de financiación para continuar con el mismo.^{5,34,35}

Por su parte, la compañía Editas ha comenzado estudios con el mismo procedimiento de EDIT-101 (AAV2 con SpCas9) para las mutaciones del síndrome de Usher 2B (Figura 19). El medicamento en estudio es el EDIT-102 y se pretende iniciar un ensayo clínico en breve. Además esta compañía también se encuentra trabajando con la Mutación autosómica dominante de la Retinitis pigmentaria 4, aunque está en fases más precoces del proceso y aún se está estudiando como posible objeto de ensayo.²⁷

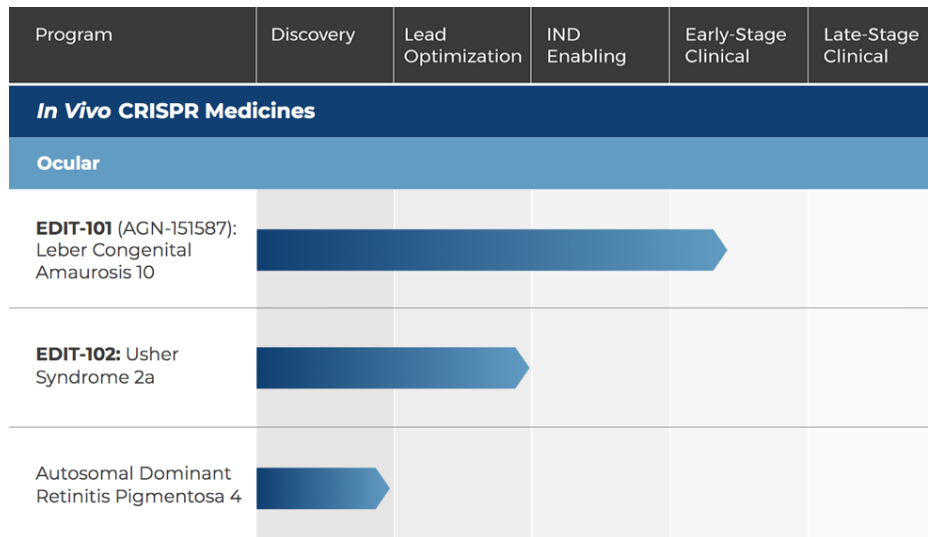


Figura 20. Estudios sobre terapia génica en la retina de la compañía Editas. EDIT-101 para la LCA10 ya está en fase clínica, EDIT-102 para el síndrome de Usher 2A está en fase preclínica y la Retinitis pigmentaria 4 aún se estudia como posible diana clínica. Tomado de Editas Medicine [13]

4.2.6. Coroideremia

El estudio genético de la coroideremia derivó en el comienzo de ensayos de fase I/II en humanos con inyección subretiniana de AAV2 con el gen defectivo en la enfermedad (CHM) corregido. Este procedimiento (SPK-7001 de Spark therapeutics, Figura 21) demostró eficacia con la mejora de la función de conos y bastones así como una mejora de la agudeza visual de 3,8 letras de media en la cartilla de Snellen. Todo ello conllevó una reducción en la incidencia de desprendimientos de retina consecuencia de los desprendimientos de fovea característicos de la enfermedad. En dos de los seis pacientes se mantuvo este efecto en los tres años y medio de seguimiento post-intervención frente a la degeneración progresiva del ojo no tratado utilizado como control. A pesar de ello uno de los pacientes experimentó un descenso de su agudeza visual. En otro estudio llevado a cabo en cinco pacientes (Simunovic et al. 2017) se demostró tolerancia al procedimiento así como resolución espontánea en el tiempo de una semana de los defectos causados por la propia inyección subretiniana. Uno de los pacientes experimentó una discreta disminución de la percepción del color. A día de hoy la compañía Nightstar Therapeutics ya ha iniciado ensayos de fase III con 140 pacientes varones e inyección de una dosis baja u otra alta de manera aleatorizada.^{5,36}


Discovery	Candidate optimization / IND-enabling	Phase 1/2	Phase 3	Approval
RETINAL DELIVERY / INHERITED RETINAL DISEASES				
LUXTURN (voretigene neparvovec-rzyl): IRD due to biallelic RPE65 mutations (US)				
LUXTURN (voretigene neparvovec): IRD due to biallelic RPE65 mutations (EU)				
SPK-7001: Choroideremia				
Stargardt disease				

Figura 21. Estudios llevados a cabo por Spark Therapeutics. En la figura se puede ver como aparte del Luxturna ya comercializado, la compañía lleva a cabo un estudio de fase I/II independiente sobre SPK-7001 (AAV2-CHM), además de encontrarse investigando sobre la enfermedad de Stargardt. Tomado de Spark Therapeutics. [16]

4.2.7. Retinosquiasis ligada al X

Dentro del grupo de las degeneraciones maculares juveniles, aparte de la enfermedad de Stargardt, existe otra entidad, la retinosquiasis ligada al X que está siendo objeto de la investigación en materia de terapia génica en varones afectados. Los primeros acercamientos a la terapia de esta enfermedad consistieron en la inyección de células pluripotentes mesenquimales en el vítreo de ratones afectados por la mutación de RS1. Estos estudios registraron una reducción del 78% en las cavidades retinianas y mejoras significativas en la conducción de los impulsos nerviosos. Sin embargo, estudios de terapia génica con inyección intravítrea de RS1 a través de vectores AAV en ratones mostraron resultados más efectivos, lo cual inspiró a que se llevasen a cabo ensayos de eficacia en humanos con AAV8. Actualmente se están llevando a cabo ensayos de fase I/II en varones humanos.^{5,37}

4.2.8. Acromatopsia

En el caso de la acromatopsia, una enfermedad autosómica recesiva, hasta ahora los únicos cuidados de esta enfermedad comprenden el uso de lentes tintadas, gafas para reducir la fotofobia así como ayudas ocupacionales para los casos severos. Hoy en día se conocen varias mutaciones que causan la enfermedad, entre las que destaca la del gen CNGB3. Varios modelos animales han demostrado que el reemplazo del gen mejora la función de los conos. A partir de estos hechos se ha comenzado en 2015 un estudio de fase I/II en humanos para estudiar la eficacia y seguridad de la transducción del gen CNGB3 mediante vectores AAV2. Además un estudio independiente ha comenzado a investigar sobre la reparación de la mutación en el gen CNGA3 mediante terapia génica.⁵

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Si atendemos a la naturaleza de las retinopatías hereditarias, es más que lógico reconocer la terapia génica como el tratamiento dirigido para estas patologías, algo de lo que se carecía hasta hace relativamente poco. Hasta el momento este grupo de enfermedades se reconocían como algo incurable y que dependía del curso de la propia enfermedad y de factores propios del individuo que se desconocían. Los únicos métodos paliativos para los terribles defectos deletéreos producidos por las retinopatías hereditarias han sido ciertos suplementos vitamínicos o terapias rehabilitadoras que bien podían mostrar un discreto o nulo beneficio en los pacientes y las múltiples comorbilidades que conlleva perder la vista, en la mayoría de los casos, a edades realmente tempranas.

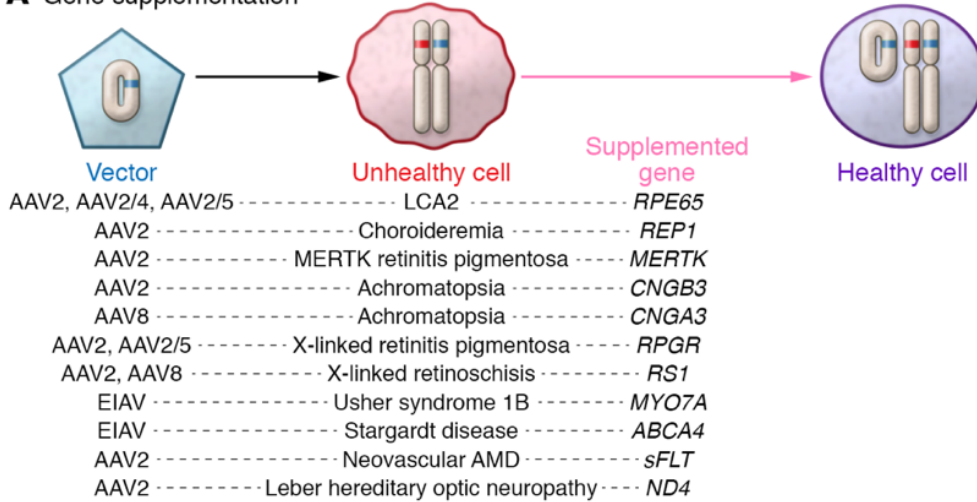
El estudio de la terapia génica ha supuesto una revolución científica, arrojando luz y descubriendo un futuro prometedor para múltiples enfermedades de causa genética. En el caso de las retinopatías hereditarias, de acuerdo con los resultados expuestos en los múltiples estudios citados en este trabajo, se evidencia la posibilidad del uso de la terapia génica como el eje principal del tratamiento de estas atípicas y devastadoras patologías.

En el futuro de la terapéutica de estas enfermedades seguramente también jueguen un papel importante los fármacos moduladores del ciclo visual y las terapias con células madre pluripotentes –ambas expuestas en este trabajo– como complementarias a la terapia génica o incluso superarla en algunos casos concretos.

En la actualidad Luxturna es el único medicamento aceptado y comercializado en Europa y América, pero como ha sido revisado en este trabajo, una larga línea otros medicamentos basados en vectores portadores de los genes responsables de las retinopatías hereditarias están siendo objeto de estudio a día de hoy. Los más cercanos a una posible futura aceptación y comercialización parecen ser Stargen y EDIT-101, pero estos no son ni mucho menos los únicos, ya que múltiples patologías como la coroideremia, la acromatopsia, el síndrome de Usher u otros tipos de LCA se beneficiarán de fármacos actualmente en estudio (Figura 22).

Si extrapolamos los positivos resultados que se van obteniendo en estos estudios y el interés que está mostrando la comunidad científica en estas patologías de origen genético, no es para nada absurdo sospechar que aún más patologías incluso menos prevalentes o con menor afectación de la visión serán objeto de estudio y diana terapéutica en el futuro de la terapia génica.

A Gene supplementation



B Genome surgery

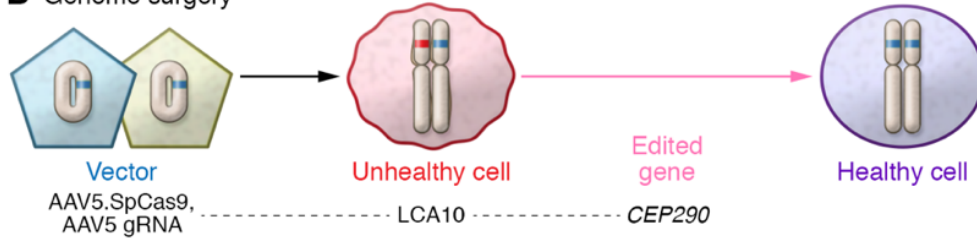


Figura 22. Estudios actuales y vectores utilizados en las diferentes retinopatías hereditarias. Se diferencian las tratadas con inyección del gen defectivo y la cirugía genómica. Tomado de *The Journal of Clinical Investigation*. [5]

BIBLIOGRAFÍA:

1. García-Porrero Pérez, J. A., Ezquerro Polo, L., il & Hurlé, J. M. Neuroanatomía humana 264–275 (Editorial Medica Panamericana, 2015).
2. Cohen, S. R. & Gardner, T. W. Diabetic Retinopathy and Diabetic Macular Edema. in *Developments in Ophthalmology* (eds. Nguyen, Q. D., Rodrigues, E. B., Farah, M. E., Mieler, W. F. & Do, D. V.) vol. 55 137–146 (S. Karger AG, 2015).
3. Modi, P. & Arsiwalla, T. Hypertensive Retinopathy. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2020).
4. Kumaran, N., Moore, A. T., Weleber, R. G. & Michaelides, M. Leber congenital amaurosis/early-onset severe retinal dystrophy: clinical features, molecular genetics and therapeutic interventions. *Br. J. Ophthalmol.* 101, 1147–1154 (2017).
5. DiCarlo, J. E., Mahajan, V. B. & Tsang, S. H. Gene therapy and genome surgery in the retina. *J. Clin. Invest.* 128, 2177–2188.
6. O'Neal, T. B. & Luther, E. E. Retinitis Pigmentosa. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2020).
7. Gill, J. S., Georgiou, M., Kalitzeos, A., Moore, A. T. & Michaelides, M. Progressive cone and cone-rod dystrophies: clinical features, molecular genetics and prospects for therapy. *Br. J. Ophthalmol.* 103, 711–720 (2019).
8. Altschwager, P., Ambrosio, L., Swanson, E. A., Moskowitz, A. & Fulton, A. B. Juvenile Macular Degenerations. *Semin. Pediatr. Neurol.* 24, 104–109 (2017).
9. MacDonald, I. M., Hume, S., Chan, S. & Seabra, M. C. Choroideremia. in *GeneReviews®* (eds. Adam, M. P. et al.) (University of Washington, Seattle, 1993).
10. Yanoff, M. & Duker, J. S. Choroideremia. in *Oftalmología* 503–509 (Elsevier Health Sciences, 2019).
11. Alory, C. & Balch, W. E. Organization of the Rab-GDI/CHM Superfamily: The Functional Basis for Choroideremia Disease. *Traffic* 2, 532–543 (2001).
12. Saad, L. & Washington, I. Can Vitamin A be Improved to Prevent Blindness due to Age-Related Macular Degeneration, Stargardt Disease and Other Retinal Dystrophies? *Adv. Exp. Med. Biol.* 854, 355–361 (2016).
13. Federspiel, C. A., Bertelsen, M. & Kessel, L. Vitamin A in Stargardt disease-an evidence-based update. *Ophthalmic Genet.* 39, 555–559 (2018).
14. Coco Martín, R. M. & Trujillo Martín, M. del M. Distrofias Hereditarias de Retina. *Minist. Sanid. Serv. Soc. E Igual. Serv. Eval. Serv. Canar. Salud* 63.

15. Hussain, R. M., Gregori, N. Z., Ciulla, T. A. & Lam, B. L. Pharmacotherapy of retinal disease with visual cycle modulators. *Expert Opin. Pharmacother.* 19, 471–481 (2018).
16. Schwartz, S. D., Tan, G., Hosseini, H. & Nagiel, A. Subretinal Transplantation of Embryonic Stem Cell–Derived Retinal Pigment Epithelium for the Treatment of Macular Degeneration: An Assessment at 4 Years. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* 57, ORSFC1 (2016).
17. Lin, T.-C. et al. Retinal prostheses in degenerative retinal diseases. *J. Chin. Med. Assoc.* 78, 501–505 (2015).
18. Miniet, R. & Fraguera, M. Terapia genica: perspectivas y consideraciones éticas en relacion con su aplicacion. *Rev. Habanera Cienc. Médicas* 7, (2008).
19. Baker, A. H. & Herzog, R. W. Did Dendritic Cell Activation, Induced by Adenovirus-Antibody Complexes, Play a Role in the Death of Jesse Gelsinger? *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 28, 704–706 (2020).
20. Capella, V. B. La revolución de la edición genética mediante CRISPR-Cas9 y los desafíos éticos y regulatorios que comporta. 19.
21. McClements, M. E. & MacLaren, R. E. Adeno-associated Virus (AAV) Dual Vector Strategies for Gene Therapy Encoding Large Transgenes. *Yale J. Biol. Med.* 90, 611–623 (2017).
22. Chacón-Camacho, Ó. F. & Astorga-Carballo, A. Terapia génica para enfermedades hereditarias oftalmológicas: avances y perspectivas. *Gac. Médica México* 11.
23. Bennett, J. et al. Safety and Durability of Effect of Contralateral-Eye Administration of AAV2 Gene Therapy in Patients with Childhood Onset Blindness Caused by RPE65 Mutations: A Follow-on Phase 1 Trial. *Lancet* 388, 661-72 (2016).
24. Luxturna epar medicie information. (2018). https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/luxturna-epar-product-information_en.pdf
25. Luxturna epar medicie overview. (2018). https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/luxturna-epar-medicine-overview_en.pdf
26. Stefanidakis et al. - Preclinical Assessment of In Vivo Gene Editing Eff (2018).
27. Research and Pipeline. Editas Medicine. <https://www.editasmedicine.com/gene-editing-pipeline/>

28. Phase I/II Study of SAR422459 in Patients With Stargardt's Macular Degeneration. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01367444>
29. Phase I/II Follow-up Study of SAR422459 in Patients With Stargardt's Macular Degeneration. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01736592>
30. Han, Z., Conley, S. M., Makkia, R. S., Cooper, M. J. & Naash, M. I. DNA nanoparticle-mediated ABCA4 delivery rescues Stargardt dystrophy in mice. *J. Clin. Invest.* 122, 3221–3226 (2012).
31. Puntel, A., Maeda, A., Golczak, M., Gao, S-Q., Yu, G., Palczewski, K. & Lu, Z-R. Prolonged Prevention of Retinal Degeneration with Retinylamine Loaded Nanoparticles. *Biomaterials* 44, 103–110 (2015).
32. Ghazi, N. et al. Treatment of retinitis pigmentosa due to MERTK mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: results of a phase I trial. *Hum. Genet.* 135, (2016).
33. Cehajic-Kapetanovic, J. et al. Initial results from a first-in-human gene therapy trial on X-linked retinitis pigmentosa caused by mutations in RPGR. *Nat. Med.* 26, 354–359 (2020).
34. Clinical trials appendices - Q3 2019 Results. Sanofi 146 (2019).
35. Drive, F. F. B. P.-5555 7168 C. G., Suite 100, Columbia & Md 21046. Usher Syndrome Research Advances. Foundation Fighting Blindness.
36. Kapetanovic, J. C., Patrício, M. I. & MacLaren, R. E. Progress in the development of novel therapies for choroideremia. *Expert Rev. Ophthalmol.* 14, 277 (2019).
37. Cukras, C. et al. Retinal AAV8-RS1 Gene Therapy for X-Linked Retinoschisis: Initial Findings from a Phase I/IIa Trial by Intravitreal Delivery. *Mol. Ther.* 26, 2282–2294 (2018).

FIGURAS:

1. Nicpon-Marieb, E. *Human Anatomy and Physiology*. (Benjamin-Cummings Publishing Company, Subs of Addison Wesley Longman, Inc, 1994).
2. Julio, S. S. *Texto atlas de histología biología celular y tisular*. (McGraw-Hill Interamericana de España S.L., 2014).
3. Barrett, K., Barman, S., Boitano, S. & Brooks, H. *Ganong fisiología médica*. (McGraw-Hill Interamericana de España S.L., 2017).
4. Retina. Ocumed <https://ocumed.es/patologias/retina/>.
5. DiCarlo, J. E., Mahajan, V. B. & Tsang, S. H. *Gene therapy and genome surgery in the retina*. *J Clin Invest* 128, 2177–2188.
6. O’Neal, T. B. & Luther, E. E. *Retinitis Pigmentosa*. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2020).
7. Alory, C. & Balch, W. E. *Organization of the Rab-GDI/CHM superfamily: the functional basis for choroideremia disease*. *Traffic* 2, 532–543 (2001).
8. *The eye and stem cells: the path to treating blindness* | Eurostemcell. <https://www.eurostemcell.org/eye-and-stem-cells-path-treating-blindness>.
9. Lin, T.-C. et al. *Retinal prostheses in degenerative retinal diseases*. *Journal of the Chinese Medical Association* 78, 501–505 (2015).
10. Schinzel, A. *Genetics and Genomics in Medicine*. *Eur J Hum Genet* 23, 719 (2015).
11. Akhtar, S. *Non-viral cancer gene therapy: Beyond delivery*. *Gene Therapy* 13, 739–740 (2006).
12. Wiley, J. *The Journal of Gen Medicine*. 22, (2020).
13. *Research and Pipeline*. Editas Medicine <file:///Users/carlosfernandez/Zotero/storage/3QJPRMHQ/gene-editing-pipeline.html>.
14. Chacón-Camacho, Ó. F. & Astorga-Carballo, A. *Terapia génica para enfermedades hereditarias oftalmológicas: avances y perspectivas*. *Gaceta Médica de México*. 11.
15. *Carta de Snellen Adulto Innovar Letras*. BIOMEDICOS.CO S.A.S. <https://www.biomedicos.co/optotipos/521-carta-de-snellen-adulto-innovar-letras-7703112000533.html>.
16. *Our Scientific Platform and Programs – Spark Therapeutics*. <https://sparktx.com/scientific-platform-programs/>.

17. *Ficha tecnica luxturna 5 x 10¹² genomas vectoriales/ ml concentrado y disolvente para solucion inyectable.*
https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/1181331001/FT_1181331001.html.

18. *Puntel, A. et al. Prolonged Prevention of Retinal Degeneration with Retinylamine Loaded Nanoparticles. Biomaterials 44, 103–110 (2015).*